

戦略的創造研究推進事業
発展研究 (SORST)

研究終了報告書

研究課題「p53 と RB 蛋白質によるアポトーシス
と細胞老化の制御」

研究期間：平成16年11月1日～
平成20年3月31日

研究代表者氏名 田矢 洋一
(国立がんセンター研究所放射線研究部部長)

1. 研究課題名

p53 と RB 蛋白質によるアポトーシスと細胞老化の制御

2. 研究実施の概要

癌抑制蛋白質 p53 はほぼ 50%のヒト癌で変異による失活が見られ、癌に関連した最も重要な蛋白質と考えられている。この p53 は細胞がさまざまなストレスを受けた時に安定化されて活性化された転写因子となり、さまざまなターゲット遺伝子を発現誘導する。その結果、ストレスの種類や程度に応じて、細胞の G1 期停止やアポトーシス、あるいは細胞老化など、異なった現象を引き起こす。この中で、アポトーシスと細胞老化の誘導機構に関しては不明なことが多いのでその解明を目指した。

もう一つの代表的な癌抑制蛋白質である RB 蛋白質は転写因子 E2F と結合してその活性を抑えることによって細胞増殖を抑えるのが主要な機能と考えられているが、アポトーシスに関しては p53 と逆で、アポトーシスを抑制する方向に働く。しかし、このアポトーシス抑制のメカニズムはほとんど不明であるので、その解明を目指した。

この研究によって、エンドサイトーシスに際して、膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が核内にも存在して p53 と結合し、p53 の転写活性化能とアポトーシス誘導に必須の働きをするという全く予想外のことを発見した。逆に、p53 が細胞膜周辺でクラスリン重鎖と共にエンドサイトーシスや細胞運動の制御を行っているらしいという、これもまた全く予想外のことを発見した。これは、細胞運動と p53 という、これまで全く無関係と思われていた 2 つのものをつなぐ新しい研究分野を開くと期待される。また、p53 の失活が癌細胞の浸潤・転移の本質に関わっていることも示唆する。

一方、p53 の N 末端側のリン酸化によって特異的に誘導されてくるターゲット蛋白質を多数同定したが、そのうちの一つに、アポトーシスを強化するエクソヌレアーゼ AEN があった。さらには、イノシトールリン脂質に特異的に結合するドメインである PH ドメインのみ持つ小さな蛋白質 POP もその中にあったが、この POP は細胞膜周辺で PIP3 等に結合することによって AKT の活性化を阻害することによってアポトーシス誘導を行う癌抑制蛋白質であることがわかった。

以前に我々は p53 の Ser46 のリン酸化が p53 のアポトーシス誘導能を制御することを示した。そこで、Ser46 キナーゼの同定を行った。そして、ATM がそれである証拠を得たが、S46 の周辺配列は LSPDD となっており、常識とな

っている ATM 認識配列(S/T-Q)とは異なる。Ser-Pro の所を ATM がリン酸化するという発見は初めてである。しかし、これには何か特殊な条件が必要らしい。

RB 蛋白質に関しては、DNA ダメージを細胞に与えると、ほとんどのリン酸化部位が脱リン酸化されるが、Ser612 のみはリン酸化が強まり、そのリン酸化が E2F-1 と RB 蛋白質との結合を促進するというこれもまた予想外の発見をした。さらに、リン酸化が Chk1 か Chk 2 でなされることも突き止めた。

3. 研究構想

p53 と RB 蛋白質は代表的な癌抑制蛋白質であり、p53 はアポトーシス誘導の方に働くが、RB 蛋白質は逆にアポトーシス抑制活性を持つ。しかし、これらのメカニズムは不明な点が多いので、先ず、そのメカニズムをもっと解明することを目標にした。さらに、この両蛋白質は細胞老化の制御にも関係すると言われているので、できればそちらのメカニズムも解明したいと考えた。

p53 の方では、我々は以前に Ser46 を Phe に変えた変異体が野生型 p53 よりもずっと強いアポトーシス誘導能を持つことを見つけていたのでそのメカニズムの解明から始めた。その結果、エンドサイトーシスに際して、膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が核内にも存在して p53 と結合し、p53 の転写活性化能とアポトーシス誘導に必須の働きをするという全く予想外のことを発見した。逆に、p53 が細胞膜周辺でクラスリン重鎖と共にエンドサイトーシスや細胞運動の制御を行っているらしいという、これもまた全く予想外のことを発見した。これは、細胞運動と p53 という、これまで全く無関係と思われていた 2 つのものをつなぐ新しい研究分野を開くと期待される。また、p53 の失活が癌細胞の浸潤・転移の本質に関わっていることも示唆する。

4. 研究実施内容

4. 1

(1) 実施の内容

(1) p53 とクラスリン重鎖

クラスリンには重鎖と軽鎖とがあり、普通は細胞表面から内部への物質取り込みであるエンドサイトーシスに働く。しかし、このクラスリン重鎖(CHC)が細胞核の中で軽鎖とは結合せずにp53と結合してp53の転写活性化能を高め、アポトーシスを強く誘導するという全く予想外のことを発見した。

その結果、クラスリンの軽鎖 (CLC) と p53 とが CHC の C 末端領域への結合で競合することを明らかにした (図1)。さらに、CLC 上の CHC への結合に使われる領域と p53 の Ser46 周辺の配列との間には有意な相同性があることも見いだした。そして、CHC は p300 ヒストンアセチラーゼと p53 との複合体形成を促進することによって p53 依存性転写活性化能とアポトーシス誘導能を高めることもわかった (図2)



図1

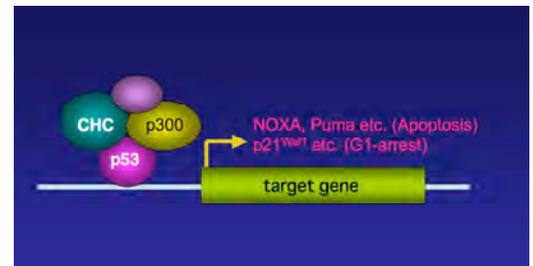


図2

そして、p53 の Ser46 周辺と CHC の結合モデルも組めるようになった。また、この CHC には NuMA と呼ばれる蛋白質が結合すること、さらにはその NuMA にグリオーマで遺伝子増幅していることが知られている Gas41 という癌遺伝子蛋白質が結合することも見つけた。この Gas41 は p53 の活性を抑制することが外国のグループによって見つけられている。

そして、逆に p53 が細胞質内の細胞膜周辺にも存在してエンドサイトーシス制御に関与しているらしいという、これまた予想外のことを見出した。特に、EGF を加えた時に細胞質の先端にある細胞膜形成を行う leading edge で p53 と CHC の局在が一致した (図3)。

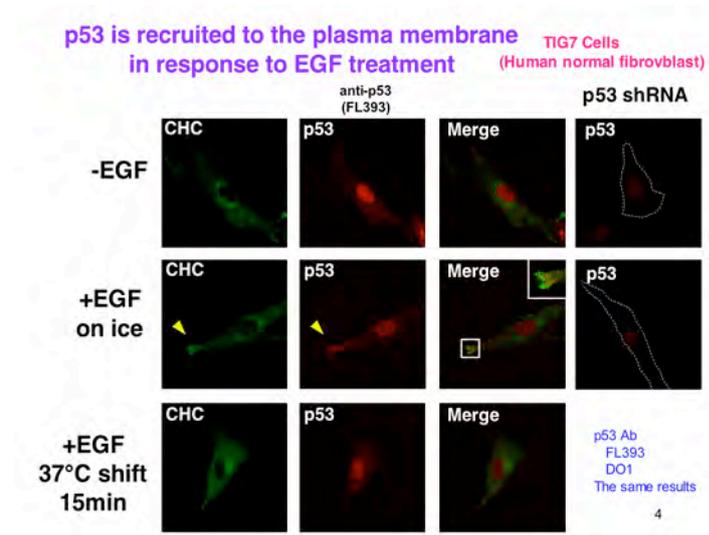


図3

さらに、p53 が細胞膜周辺でアクチンファイバーに沿ってに存在することはゴールドラベルした p53 抗体を用いた免疫電子顕微鏡でも確認した(図 4)。

Association between p53 and F-actin in response to EGF treatment

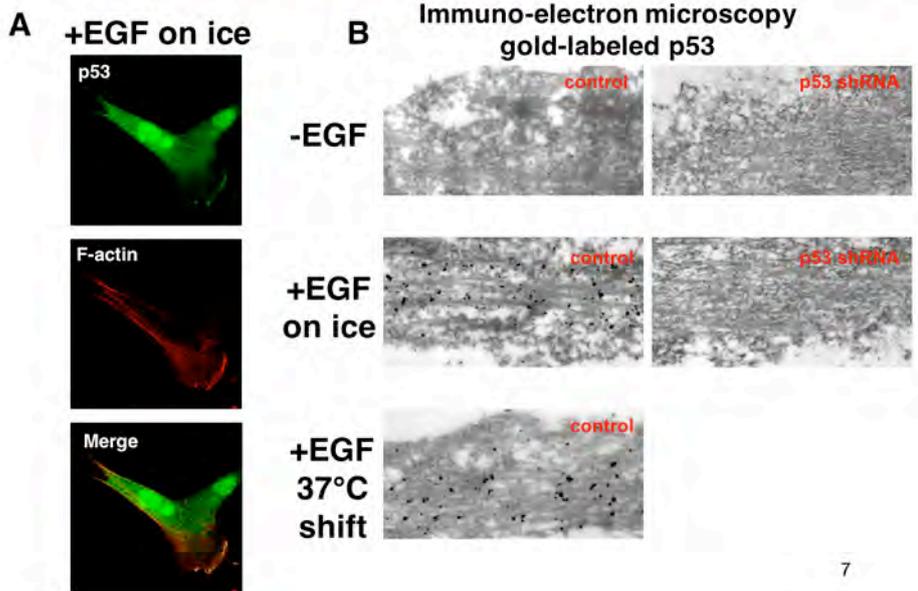


図 4

p53 をノックダウンすると細胞膜周辺でのアクチンのメッシュ構造が形成されなくなることも見つけた(図 5)。

Mesh-like structure of F-actin is impaired in p53-depleted cells

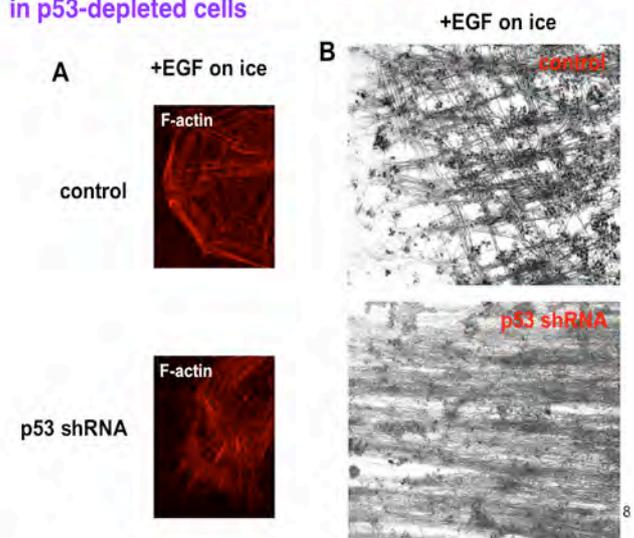


図 5

さらには、p53 をノックダウンすると細胞の運動が高まり、そこに p53 を発現させると、また運動が抑制されることもわかった(図 6 および 7)。

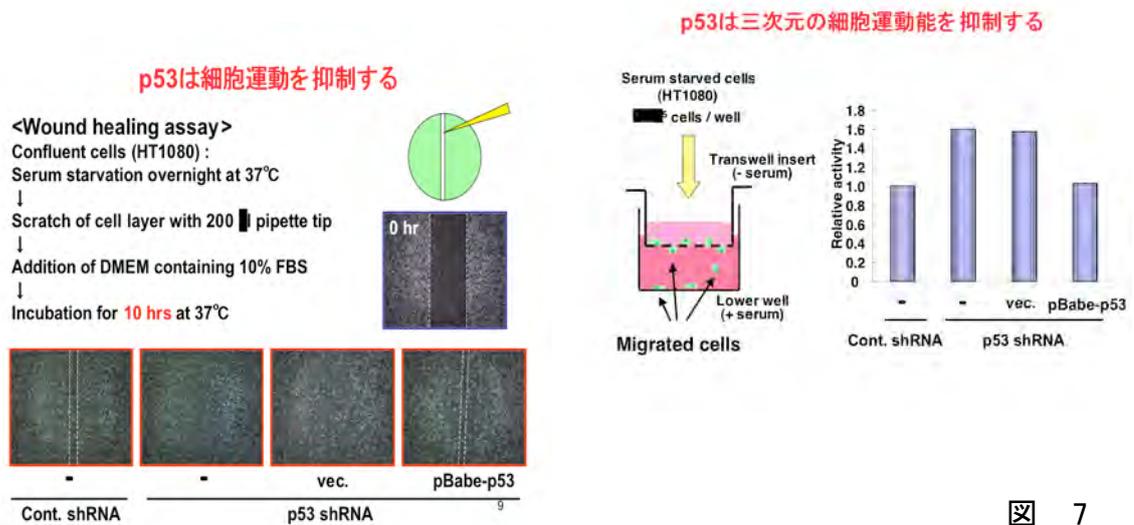


図 6

図 7

これらのデータは p53 が細胞膜周辺でエンドサイトーシスのみならず細胞運動をも制御していることを示唆している。これはまた、p53 の失活が癌細胞の浸潤・転移の本質に関わっていることも示唆する。

(2) p53 の Ser46 をリン酸化する酵素の同定

以前に我々は p53 の Ser46 のリン酸化が p53 のアポトーシス誘導能を制御することを示した。そこで、Ser46 キナーゼの同定を行った。そして、ATM がそれである証拠を得たが、S46 の周辺配列は LSPDD となっており、常識となっている ATM 認識配列(S/T-Q)とは異なる。Ser-Pro の所を ATM がリン酸化するという発見は初めてである(図 8)。

in vitro では、ATM は p53 分子上の S46 は効率的にリン酸化できるが、周辺配列を持つペプチドは基質にできない。ATM の認識配列を満たす S15 のリン酸化は、p53 分子、ペプチドのどちらを用いても効率的に起きることから、S46 のリン酸化には、特異的な結合因子などの必要条件が存在するものと考えられる。

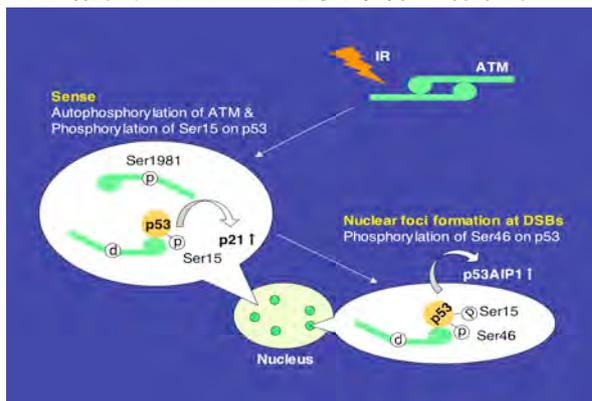


図 8

(3) p53 によって誘導されてアポトーシスを誘導する POP

我々が同定した新規 p53 標的遺伝子のうち POP 遺伝子は、イノシトールリン脂質(PIPs)との結合に働く PH ドメインのみから構成されるタンパク質をコードしている。POP タンパク質は、PH ドメイン以外の機能ドメインを持たないため、他の PH ドメインを持つタンパク質と競合して PIPs と結合し、他の PH ドメインタンパク質によるシグナル伝達を遮断する機能を有すると考えられる。実際に、細胞内において、また in vitro 実験系において、POP が PH ドメインを持つタンパク質で細胞の生存シグナル伝達の主役である Akt と PIPs との結合を直接阻害し、Akt の生存シグナルを遮断していることが明らかになった。一方、POP 発現を抑制した細胞株においては、Akt の活性が増強するとともに、p53 依存性アポトーシスが減弱する事が示され、p53 の下流で、POP が Akt の抑制を介してアポトーシス誘導に働いている事が示された (図 9)。Akt 遺伝子は癌遺伝子としても知られており、多くの癌で Akt 活性の異常な増強が見られている。

POPはp53の下流で、新規Akt抑制経路により 癌抑制能を発揮する

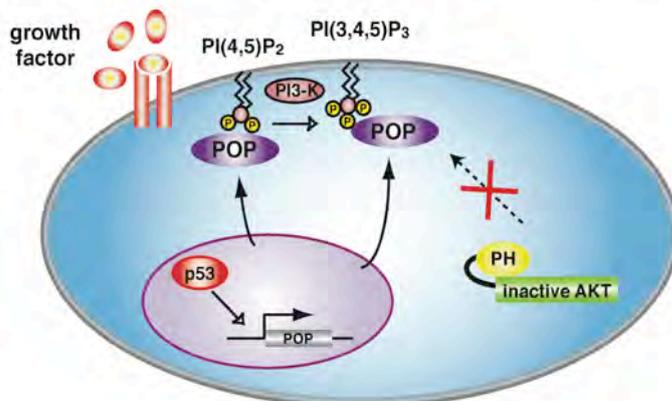


図 9

(4) DNA ダメージ時における RB 蛋白質の Ser612 の特異的リン酸化

RB 蛋白質に関しては、DNA ダメージを細胞に与えると、ほとんどのリン酸化部位が脱リン酸化されるが、ポケット A と B の間のスペーサー領域にある Ser612 のみはリン酸化が強まり、そのリン酸化が E2F-1 と RB 蛋白質との結合を促進するというこれまた予想外の発見をした。しかも、このリン酸化は Cdk インヒビターで阻害されないため Cdk 以外のキナーゼによってなされると推定されたが、Chk1 か Chk2 でなされることも突き止めた (図 10)。

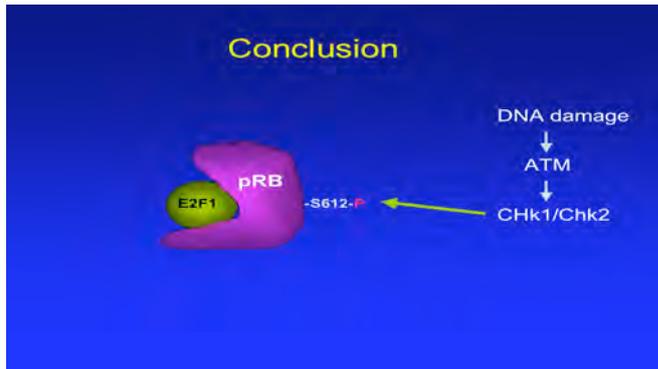


図 10

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

p53 や RB 蛋白質の研究を行っている研究者は世界中に多数いるが、我々の成果はほとんどすべて誰も予想していなかった独自のものである。特に p53 が細胞膜周辺で細胞運動の制御に関与しているという発見は p53 が癌の浸潤・転移にも関係していることをしており、癌研究に新たな一石を投じることになると考えている。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

p53 や RB 蛋白質のリン酸化などの研究を行っている研究者は世界中で多くなったが、もともとは私がそれらのリン酸化部位特異的抗体を多数作製して世界に先駆けて始めて来たものである。

6. 研究実施体制

(1) 体制

すべて国立がんセンター研究所放射線研究部の田矢グループのみで行った。

(2) メンバー表

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期	備考
田矢 洋一	国立がんセンター研究所	部長	研究全体の統括	H16.11～H20.3	
岡本 康司		室長	Mdm2とMdmx	H16.11～H20.3	
江成 政人		室長	p53とクラスリン	H16.11～H20.3	
大木 理恵子		研究員	POP	H16.11～H20.3	
塩川 大介		JST 研究員	細胞膜周辺での p53の機能	H19.4～H20.3	
児玉 昌美		JST 研究員	Ser46キナーゼ	H16.11～H19.9	
藤中 恭子		JST研究補助 員	細胞の培養・維持	H16.11～H.19.3	
有馬 好美		JST 研究員	EMTとRB蛋白質	H.18.4～H19.9	
高橋理恵子		秘書		H16.11～H20.3	
大森 一二		大学院生	クラスリンとp53	H16.11～H19.3	
大畑 広和		リサーチ レジデント	クラスリンとp53	H18.4～H20.3	
遠藤 克枝		大学院生	クラスリンとp53	H16.11～H19.3	
佐藤 渉		JST 研究員	p53依存性アポト ーシス誘導遺伝 子	H16.11～H18.7	
井上 靖道		リサーチ レジデント	RBのリン酸化	H16.11～H19.3	
川瀬 竜也		大学院生	POP クラスリンと p53	H16.11～H20.3	
吉田 祐輔		大学院生		H.17.4～H20.3	

大坪 千裕		大学院生	Mdm2 結合蛋白質	H.18.4～H20.3	
杉山 温美		大学院生	クラスリンと p53	H.18.4～H20.3	
小関 知子		大学院生	p53	H.18.4～H20.3	
唐澤 隆俊		JST 研究員	RB のアポトーシ ス抑制機構	H16.1～H.17.6	
立田 大輔		JST 研究員	DNAダメージ・シ グナル	H.17.4～H.18.3	
石田 三智子		リサーチ レジデント	Mdm2 結合蛋白質	H.17.4～H.18.3	
加島 健史		大学院生	Mdmx のリン酸化	H16.1～H.18.3	

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H18. 5.20-24	第13回 p53 国際ワークショップ	ニューヨーク	300名	田矢が国際オーガナイザーの一人となった。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Carol Prives 米国コロンビア大学教授	第20回国際生化学・分子生物会議と国立がんセンターでの招待講演	京都および東京	2006年6月16日～24日
Peter Sicinski ハーバード大学医学部教授	同上	同上	2006年6月19日～28日

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表 (英文論文 18 件 邦文論文 0 件)

1. Takagi, M., Tsuchida, R., Oguchi, K., Shigeta, T., Nakada, S., Shimizu, K., Ohki, M., Delia, D., Chessa, L., Taya, Y., Nakanishi, M., Tsunematsu, Y., Bessho, F., Isoyama, K., Hayashi, Y., Kudo, K., Okamura, J., Mizutani, S.: Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood*, 103, 283-290 (2004)
2. Qu, L., Huang, S., Baltzis, D., Rivas-Estilla, A., Hatzoglou, M., Koumenis, C., Taya, Y., Yoshimura, A. and Koromilas, A.E.
Endoplasmic reticulum stress impairs the nuclear import of p53 and prevents p53-mediated apoptosis through the activation of the glycogen synthetase kinase 3 β .
Genes & Dev., 18, 261-277 (2004)
3. Ohtani, S., Kagawa, S., Tango, Y., Umeoka, T., Tokunaga, N., Tsunemitsu, Y., Roth, J.A., Taya, Y., Tanaka, N. and Fujiwara, T.: Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 in vivo. *Mol. Cancer Ther.*, 3, 93-100 (2004)
4. Takai, T., Fukazawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and Hirai, H.: Preferences in phosphorylation sites in the retinoblastoma protein between D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 *in vitro*.
J. Biochem., 137, 381-386 (2005)
5. Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M. and

- Saya, H.: Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 280, 19166-19176 (2005)
6. Merlo, P., Fulco, M., Costanzo, A., Mangiacasale, R., Strano, S., Blandino, G., Taya, Y., Lavia, P. and Levrero, M.: A role of p73 in mitotic exit. *J. Biol. Chem.*, 280, 30354-30360 (2005)
 7. Bae, B.-I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.-D., Moran, T.-H., Montell, C., Ross, C.-A., Snyder, S.-H. and Sawa, A. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's Disease. *Neuron*, 47, 29-41(2005)
 - 8. Okamoto, K., Kashima, K., Pereg, Y., Ishida, M., Yamazaki, S., Nota, A., Teunisse, A., Migliolini, D., Kitabayashi, I., Marine, J., Prives, C., Shiloh, Y., Jochemsen, A. and Taya, Y. DNA damage-induced phosphorylation of Mdmx at serine 367 activates p53 by targeting Mdmx for Mdm2-dependent degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 9608-9620 (2005)
 - 9. Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I. and Taya, Y. Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes & Dev.*, 20, 1087-1099 (2006)
 10. Ohkubo, S., Tanaka, T., Taya, Y., Kitazato, K. and Prives, C. Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53 dependent transcription. *J. Biol Chem.*, 281, 16943-16950 (2006)
 11. Pereg, Y., Lam, S., Teunisse, A., Biton, S., Meulmeester, E., Mittelman, L., Delia, D., Okamoto, K., Taya, Y., Shiloh, Y. and Jochemsen, A. Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylation of Hdmx in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 6819-6831 (2006)
 12. Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.-C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J. and Shiloh, Y. Chromatin relaxation in response to DNA double strand breaks: a novel ATM and KAP-1-dependent pathway. *Nature Cell Biol.*, 8, 870-876 (2006)
 13. Okamoto, K., Kitabayashi, I. and Taya, Y. KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 216-222 (2006)
 14. Ohki, R., Kawase, T., Ohta, T., Ichikawa, H. and Taya, Y. Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci.*, 98, 189-200 (2007)
 - 15. Inoue, Y., Kitagawa, M. and Taya, Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J.*, 26, 2083-2093 (2007)
 16. Junttila MR, Puustinen P, Niemela M, Ahola R, Arnold H, Bottzauw T, Ala-aho R, Nielsen C, Ivaska J, Taya Y., Lu SL, Lin S, Chan EK, Wang XJ, Grenman R, Kast J, Kallunki T, Sears R, Kahari VM, Westermarck J. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*, 130, 51-62 (2007)
 - 17. Ohmori, K., Endo, Y., Yoshida, Y., Ohata, H., Taya, Y.* and Enari, M.*

(* co-corresponding authors)

Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription.
Onconeg, in press

- 18. Endo, Y., Sugiyama, A., Li, S-A., Ohmori, K., Ohata, H., Yoshida, Y., Shibuya, M., Takei, K., Enari, M. and Taya, Y.
Regulation of clathrin-mediated endocytosis by p53. *Genes Cells*, 13, 375-386 (2008).
19. Kawase, T., Ichikawa, H., Ohta, T., Nozali, N., Tashiro, F., Ohki, R. and Taya, Y.
p53 target gene AEN is a nuclear exonuclease required for p53-dependent apoptosis.
Onconeg, in press
20. Abe Y, Oda-Sato E, Tobiume K, Kawauchi K, Taya Y, Okamoto K, Oren M, Tanaka N.
Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2.
Proc Natl Acad Sci U S A., 105, 4838-4843 (2008).

(2) 口頭発表

①学会

国内 28 件, 海外 7 件

②その他

国内 40 件, 海外 11 件

(3) 特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	0
海外出願	0
計	0

(4) その他特記事項

9. 結び

アポトーシスに関しては予想外の発見等も含めてかなりの新しい成果を上げられたと思うが、細胞老化に関してはほとんど研究が進展しなかった。私は本年 6 月からシンガポール国立大学に新しくできる癌研究所(Cancer Research Center of Excellence)の教授となって移るが、そこでこれまでの成果をさらに発展させる予定である。また、これまで私の研究室にいて、国内に残る研究者達とも共同研究を続ける。

SORST の研究費は金額が大きいだけでなく、文科省の科学研究費や厚労省の研究費と比べても自由度が大きく、使いやすくて非常にありがたかったです。

